



Attorney Docket No. 58777.000008

THW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application Number : 10/030,452  
Applicant : Masayuki YABUTA et al.  
Filed : January 10, 2002  
Title : METHODS FOR REDUCING THE FORMATION OF BY-PRODUCTS IN THE PRODUCTION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDES  
TC/Art Unit : 1653  
Examiner: : Agnes Beata Rooke  
Docket No. : 58777.000008  
Customer No. : 21967

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-145

Sir:

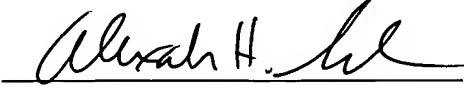
In accordance with 37 C.F.R. § 1.55, Applicants respectfully submit the certified copy of Japanese Patent Application No. 2000-137228, filed May 10, 2000, in connection with the above-identified patent application filed on January 10, 2002.

No fee is believed due as a result of this submission. However, if a fee is due upon the filing of this priority document, please charge such fee to the undersigned's Deposit Account No. 50-0206.

Respectfully submitted,

November 16, 2005

By:

  
Robert M. Schulman  
Registration No. 31,196

Alexander H. Spiegler  
Registration No. 56,625

HUNTON & WILLIAMS LLP  
1900 K Street, N.W.  
Suite 1200  
Washington, D.C. 20006-1109  
(202) 955-1500 (telephone)  
(202) 778-2201 (facsimile)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日      2000年 5月10日  
Date of Application:

出願番号      特願2000-137228  
Application Number:

国際条約による外国への出願  
用いる優先権の主張の基礎  
なる出願の国コードと出願  
番号  
country code and number  
of our priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出願人      サントリー株式会社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2005年11月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中嶋



出証番号 出証特2005-3091555

【書類名】 特許願  
【整理番号】 001013  
【提出日】 平成12年 5月10日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12P  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地  
1 サントリー株式会社 医薬センター内  
【氏名】 藤田 雅之  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地  
1 サントリー株式会社 医薬センター内  
【氏名】 澤野 俊博  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地  
1 サントリー株式会社 医薬センター内  
【氏名】 増田 由美子  
【発明者】  
【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地  
1 サントリー株式会社 医薬センター内  
【氏名】 大末 和廣  
【特許出願人】  
【識別番号】 000001904  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

**【代理人】**

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2  
06 区 ユアサハラ法律特許事務所

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100071124

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 今井 庄亮

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100076691

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 増井 忠式

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100075236

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100075270

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 小林 泰

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100091638

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 051806**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 9706781**【ブルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することによりセリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法。

【請求項 2】 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、セリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とするセリン残基を含有するポリペプチドの製造方法。

【請求項 3】 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、宿主細胞が原核細胞又は真核細胞である請求項 1乃至2記載の方法。

【請求項 4】 宿主細胞が、微生物である請求項 3記載の方法。

【請求項 5】 微生物が、大腸菌である請求項 4記載の方法。

【請求項 6】 セリン残基を含有するポリペプチドの分子量が約1000～20000である請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 セリン残基を含有するポリペプチドが、心房性ナトリウム利尿ペプチドである請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 心房性ナトリウム利尿ペプチドが、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドである請求項 7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子組換え技術を用いたポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換

えポリペプチドの製造方法に関するものである。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

生理活性ポリペプチドの生産においては遺伝子組換え技術が汎用されている。本来、遺伝暗号の翻訳は通常極めて忠実に行われるが、目的ポリペプチド遺伝子の翻訳時において当該目的ポリペプチドのみならず、コドン表で指定されたアミノ酸とは異なるアミノ酸又はアミノ酸誘導体が取り込まれたポリペプチドが副生成する場合がある。例えば、リボソームのmRNA翻訳の正確度については、高度に精製されたシステインを含まない大腸菌タンパク質であるフラジエリンに [<sup>35</sup>S] Cysが取り込まれる割合から推定した場合、当該アミノ酸が取り込まれる確率はコドン当たり約 $10^{-4}$ であった。抗生物質のストレプトマイシンが存在するとコドン表で指定されたアミノ酸とは異なるアミノ酸が取り込まれる確率が著しく増大し、当該翻訳はArgコドン (CGUとCGC) がCysコドン (UGUとUGC) に取り違えられるためと考えられている（ヴォート生化学（下），第2版，東京化学同人，p869-870, 1998）。

### 【0003】

また、Tsaiらは、ヒトIL-2の大腸菌内での発現において、本来メチオニンが取り込まれるべき位置に高頻度でノルロイシンが挿入されることを報告している(Tsai, L. B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 156, p733-739, 1988)。同様の報告がウシソマトロピンの発現 (Bogosian, G. et al., J. Biol. Chem., Vol. 264, p531-539, 1989) にも見出されており、これらは大腸菌のロイシン合成経路の活性化により、細胞内でノルロイシンが合成され、これがメチオニンの代わりにメチオニンtRNAに付加された結果、発現したタンパク質に取り込まれたものと推定されている。

### 【0004】

更にノルロイシンの取り込みとは別に、Apostolらは大腸菌による組換えヘモグロビンの生産において、本来ロイシンが取り込まれるべき位置にノルバリンが取り込まれたことを示している (Apostol I. et al. J. Biol. Chem., Vol. 272, p28980-28988, 1997)。この場合についても、大腸菌のロイシン合成経路の活

性化がノルバリンの生成に結びつきロイシンの代わりに取り込まれたものと推測されている。

### 【0005】

上記事例のうち、メチオニンの代わりにノルロイシンが目的ポリペプチドに取り込まれる事例においては、発酵培地中のメチオニン及び／若しくはロイシンの濃度を増加させるか、又はノルロイシンの量を減少させるか、あるいは双方を行うことによって、培地中で増殖させた形質転換微生物において発現される異種ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを抑制する方法が知られている（日本国特許第2879063号、米国特許第5599690号）。

### 【0006】

一方、本発明者らは、大腸菌を宿主細胞とした遺伝子組換えによるヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド（human atrial natriuretic peptide：以下、hANPと記載することもあり、アミノ酸配列は配列番号1に示す通りである：Kangawa, K. et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 118, p131-139, 1984）の効率的な生産方法を検討した結果、hANPを融合タンパク質から生産する効率的生産方法の構築に成功した（日本国特許第1963624号）。本生産方法において融合タンパク質は、大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼのN末端部分の97アミノ酸から成る保護ペプチド、リジン残基を含む3アミノ酸残基のリンカー配列（Gln-Phe-Lys）及びhANPより構成され、この融合タンパク質遺伝子はpBR322由來の発現ベクター上にコードされている。融合タンパク質遺伝子の転写は大腸菌由來のラクトースプロモーターにより行われ、発現した融合タンパク質は大腸菌内で封入体として蓄積する。得られた融合タンパク質は変性剤で可溶化後、リジン残基を特異的に認識し切断するプロテアーゼであるAPI（アクロモバクター プロテアーゼ I [Masaki, T. et. al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 660, p51-55, 1981]）を作用させることでhANPが遊離し、クロマトグラフィーによる精製を経てhANPが得られる。

本発明者らはこのhANP生産プロセスを検討していく中で、hANPに物理化学的性質が類似し、クロマトグラフィー操作による分離が容易ではない不純物を見出した。この不純物は分析用の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）

による分析において、hANPの溶出位置のわずか後方に溶出される物質として検出され、酵素反応で切り出されたhANPに対して約5%の割合で存在する（以後この不純物である副生成ポリペプチドをR1と記載する）。また、当該R1は生産スケールで用いられる分取用のHPLCを用いた場合、hANPとはベースライン分離せず、hANPの溶出ピークのテール部分に重なって溶出するため、容易に分離できない性質を有していた。

hANPは急性心不全の治療用医薬品としても使用されており、このように医薬品として使用されるhANPは高純度であることが重要である。現在の生産方法でも充分に医薬品としての純度は確保されているが、精製工程において副生成ポリペプチドであるR1を除去するために収量が減ってしまうことが生産コストの面から問題であった。従って、当該不純物の生成を抑える手段を見出すことは、高純度のhANPを生産する上で重要な課題であった。

#### 【0007】

そこで本発明者らは この不純物について解析すべく、分析用C18逆相高速液体クロマトグラフィーを用いてR1ピークを分取し、その構造解析を行った。分析はマススペクトル分析、アミノ酸配列分析により行った。その結果、R1はhANPに比べ分子量が42だけ大きい物質であることが確認された。またR1のアミノ酸配列を分析したところ、hANPと同じアミノ酸配列であったことから、R1はhANP中のあるアミノ酸が別のアミノ酸と置換されたものではなく、何らかの修飾を受けたアミノ酸が含まれたhANPの誘導体であると判断された。

#### 【0008】

さらに、もし修飾部位が複数個存在した場合、それらの組み合わせにより生ずる多数の誘導体の出現を考えられるが、実際は分析用HPLCでシングルピークしか得られておらず、このことから修飾部位は1箇所と考えられた。修飾基の構造については、生合成の過程において生ずる修飾反応でかつ分子量が42であったことから、アセチル化されたものであることが考えられる。

アセチル化の部位についてはhANPのアミノ酸配列から、セリン残基、アルギニン残基及びチロシン残基に対する修飾の可能性が考えられるため、まずhANPのC末端に1箇所存在するチロシン残基についてC末端アミノ酸分析を行った

ところ、R 1 の C 末端アミノ酸はチロシンであることが判明し、チロシン残基における修飾の可能性は否定された。さらにアルギニン残基についてはアルギニンを特異的に認識するプロテアーゼ（トリプシン）の切断が R 1 においても正常に行われることからその可能性は低いと考えられる。従って、アセチル化はセリン残基において生じているものと判断した。これはセリンのアセチル体である O-アセチルセリン残基は細胞内で合成されることが判明しており、ポリペプチドへの翻訳時にセリン残基の代わりに取り込まれる可能性があることからも十分に考えられる。また、R 1 がポリペプチドへの翻訳時に生じていることは、融合タンパク質から hANP を遊離させた時点から R 1 が検出できることからも推測される。従って、R 1 に生じた修飾は、融合タンパク質の発現時に生じたものであり、精製過程で生じたものではないと判断された。

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

遺伝子組換えポリペプチドの製造において、精製工程において不純物である副生成物を除去するために収量が減ってしまうことが生産コストの面から問題となる場合があり、当該副生成物の生成を抑える手段を見出すことは、高純度の遺伝子組換えポリペプチドを生産する上で重要である。従って、本発明は遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法に関する。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは培養工程において R 1 の生成を減少させることを検討した。大腸菌を宿主細胞として組換えペプチドを生産した場合、分子量を 42 だけ大きくするような修飾についての報告はなく、従って、R 1 に関して生成を抑制する手段について全く不明であった。そこで本発明者らは、タンパク質の構成成分であるアミノ酸に着目し、培地へアミノ酸を添加することで当該アミノ酸の生合成を抑制し、O-アセチルセリン等の生合成中間体の生成を抑制することにより R 1 の生成を抑制することを試みた。

#### 【0011】

検討は18種類（L-アラニン、グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-メチオニン、L-システイン、L-トリプトファン、L-プロリン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-スレオニン、L-アルギニン、L-リジン及びL-ヒスチジン）のアミノ酸のいずれかを添加してhANP生産菌を培養し、hANP及びR1の生成量を比較することにより行った。

#### 【0012】

なお、L-バリン添加は菌の増殖阻害を引き起こすため実施しなかった。またL-チロシンの添加はチロシンの溶解度が低く、大量培養時に不適切と考えられたため検討しなかった。

#### 【0013】

検討の結果、18種類のL-アミノ酸のうち、グリシン、ヒスチジンあるいはメチオニンの添加がR1生成を50%以上抑制し、これらのアミノ酸の添加がR1生成の抑制の効果が大きいことが明らかになった。即ち、これらのアミノ酸を培地へ添加することで、R1の生成が抑制されること、また菌体当たりの封入体生産量も増加させる効果もあることが明らかとなり、高純度のhANPを大量生産する際に有用な方法であることが判明した。なお、上記アミノ酸の添加量は、培養終了時点においても、添加したアミノ酸（グリシン、ヒスチジン及び／又はメチオニン）の生合成が抑制される量を培地中に添加すればよく、例えば、培養中に培地中のアミノ酸含有量をモニターしてそれが欠乏しないように適宜添加してもよい。また菌体のアミノ酸組成（Frederick C.H. et al., Chemical Composition of Escherichia coli in Escherichia coli and Salmonella, second edition, ASM press, p.13-16に記載）、得られる菌体濃度、発現させるタンパク質のアミノ酸組成及びその発現量により、必要とされる添加アミノ酸量を算出し、それが培養終了時点においても十分に残存する量を最初から培地中に添加することも可能である。

#### 【0014】

本発明の実施例においてはグリシン、ヒスチジン又はメチオニンについてそれぞれのアミノ酸を単独で添加した場合についての検討を実施したが、これらを

組み合わせることにより、さらにR1の生成が抑制されることは十分に期待できる。

### 【0015】

また発明者らはhANP生産を例にこれらの検討を実施したが、遺伝子組換え技術を用いたポリペプチドの生産において+42の分子量を与える不純物の生成はhANP以外のペプチド又はタンパク質（特にセリンを含有するもの）を生産する場合でも十分に起こり得るものであり、本方法は遺伝子組換えで生産するペプチド又はタンパク質に広く適応できる。また、ペプチド又はタンパク質の構造によつては、1個のセリン残基のみならず、複数のセリン残基を有する場合があり、その複数のセリン残基の1以上にO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物が1以上生成することが考えられ、本発明はそれらの生成の抑制をすることも期待できる。

### 【0016】

本発明において適応が可能なペプチドの例としては、A-type Natriuretic Peptide、B-type Natriuretic Peptide、Bradykinin、Big Gastrin、Calcitonin、Calcitonin gene related peptide、Corticotropin Releasing Factor、Cortistatin、C-type Natriuretic Peptide、Defesin 1、Elafin、 $\alpha$ -Endorphin、 $\beta$ -Endorphin、 $\gamma$ -Endorphin、Endothelin-1、Endothelin-2、Big Endothelin-1、Big Endothelin-2、Big Endothelin-3、Enkephalin、Galanin、Big Gastrin、Gastric Inhibitory Polypeptide、Ghrelin、Glucagon、Glucagon-like peptide -1、Glucagon-like peptide -2、Growth Hormone Releasing Factor、Histatin 5、Insulin、Joining Peptide、Luteinizing Hormone Releasing Hormone、Melanocyte Stimulating Hormone、Midkine、Neurokinin A、Neuropeptide Y、Neurotensin、Oxytocin、Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide、Parathyroid Hormone、PTH related peptide、Peptide Histidine-Methionine-27、Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 38、Platelet Factor -4、Peptide T、Secretin、Serum Thymic Factor、Somatostatin、Urocortin、Vasoactive Intestinal Peptide及びこれらの誘導体が挙げられ、タンパク質の例としてはGrowth Hormone及びその誘導体を挙げる

ことができる。

### 【0017】

本発明では、セリン残基を含有するポリペプチドの分子量が約1000～2000であるポリペプチドについて実施することが好ましい。また、セリン残基を含有するポリペプチドが、心房性ナトリウム利尿ペプチドであることがより好ましく、心房性ナトリウム利尿ペプチドが、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドであることが最も好ましい。

### 【0018】

本発明に用いることができる宿主細胞は、遺伝子組換えポリペプチドの製法に用いることができるものであれば特に限定されるものではない。例えば、原核細胞又は真核細胞の何れでもよく、原核細胞としては細菌（大腸菌、枯草菌等）、真核細胞としては酵母（Saccharomyces属等）、動物細胞（CHO細胞等）を挙げることができる。宿主細胞としては、細菌、酵母などを含む微生物が好ましく、特に大腸菌が好ましい。

### 【0019】

即ち、本発明は以下のものに関する。

- a) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することにより、副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法、
- b) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法、
- c) 副生成ポリペプチドの分子量が遺伝子組換えポリペプチドに対して+42の修飾を受けた誘導体であるa) 又はb) 記載の方法、
- d) 副生成ポリペプチドがアセチル化された誘導体であるa) 乃至c) 記載の方法、
- e) 遺伝子組換えポリペプチドがセリンを分子内に有するポリペプチドであるa) 乃至d) 記載の方法、

- f) 遺伝子組換えポリペプチドの分子量が約1000～20000である a) 乃至 e) 記載の方法、  
 g) 遺伝子組換えポリペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチドである f) 記載の方法、  
 h) 心房性ナトリウム利尿ペプチドがヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドである  
 g) 記載の方法、  
 i) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において  
 、宿主細胞が原核細胞又は真核細胞微生物である a) 乃至 h) 記載の方法、  
 j) 宿主細胞が、微生物である i) 記載の方法、及び  
 k) 微生物が、大腸菌である j) 記載の方法。

### 【0020】

#### 【実施例】

以下に、実施例において本発明を詳細に述べる。本発明についての種々の変更、修飾を行うことが当業者には可能であり、従って、本発明は実施例に限定されることなく、これらの変更、修飾をも含むものである。

### 【0021】

#### 【実施例1】 発現ベクターの作製

大腸菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼのN末端部分の97アミノ酸から成る保護ペプチド（配列番号2）、リジン残基を含む3アミノ酸残基のリンカー配列（Gln-Phe-Lys）及びhANP（配列番号1）より構成される融合タンパク質をコードする遺伝子を、BamHI-PvuII領域を欠失させたpBR322（Nature. 1980; 283:216-8）のEcoRI、DraI部位にクローニングし、発現ベクターpGH $\alpha$ 97SIIを作製した（図1：融合タンパク質遺伝子配列は省略）。発現ベクターの構築方法は常法に従った。

### 【0022】

#### 【実施例2】 R1の同定

##### (1) 培養及び封入体回収

上記の発現プラスミドが導入された大腸菌W3110株（W3110/pGH $\alpha$ 97SII）を、ジャーファーメンターを用いて表1に示すNU培地を用いて培養した。

### 【0023】

## 【表1】

表 1 NU培地の組成（培地 1L 当たり）

酵母エキス	4 g
リン酸2水素カリウム	4 g
リン酸水素2カリウム	4 g
リン酸水素2ナトリウム	2.8 g
塩化アンモニウム	0.2 g
硫酸アンモニウム	1.2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	40 mg
MnSO <sub>4</sub> · nH <sub>2</sub> O	10 mg
AlCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.5 mg
テトラサイクリン塩酸塩	2mg

## 【0024】

培養はグルコース濃度4.5%、33℃、pH7.0、溶存酸素濃度30%の条件で行い、pH及び溶存酸素濃度はそれぞれアンモニア水の滴下、攪拌回転数の上昇により制御した。グルコースが消費された後、培養温度を37℃に制御してグリセロールを炭素源として逐次添加することにより、hANP融合タンパク質の発現を促し、約30時間の培養を行った。培養後の菌体には封入体の形成が認められ、発現した融合タンパク質は全菌体タンパク質の30%以上であった。

## 【0025】

培養後、マントンゴーリンホモジナイザー(15M-8AT)を用いて、培養液を500Kg/cm<sup>2</sup>の条件でホモジナイズ処理し、遠心機により沈殿画分（封入体）を回収した。次に、培養液と等量の30mM Tris-HCl (pH9.3)緩衝液を添加し、懸濁後、再度遠心分離を行い、沈殿を回収した。この洗浄操作をさらにもう一度繰り返し、最終的に得られた沈殿を適量の30mM Tris-HCl (pH9.3)緩衝液に懸濁した。

## (2) R 1 の検出

次に、得られた封入体を5M 尿素を含む30mM Tris-HCl (pH9.3)緩衝液に懸濁・

溶解した。封入体は水に懸濁した場合、OD660値が220になる分量を使用した。この封入体溶解液に、3.5ユニット/Lの割合でAPI（和光純薬）を添加し、30℃で1.5時間切断反応を実施した。図2は酵素反応の終了後、切り出されたhANPを逆相HPLCで分析したものである。分析はカラム温度40℃、流速1ml/min.、A液；トリフルオロ酢酸溶液（1→1000）、B液；アセトニトリル・トリフルオロ酢酸溶液（0.95→1000）混液（1:1）を使用し、B液の初期濃度を43%とし、分析開始後B液を一定量ずつ増加させて、16分間で52%となるようなグラジエント法により行った。R1はhANPに対する相対溶出時間が1.1の不純物として検出された。

#### （3）R1の精製

次に、R1の構造分析のため、R1の精製を行った。酵素処理の終了後の反応液にpHが5.0となるように酢酸を添加し、保護ペプチドを沈殿させた後、沈殿を遠心分離で除去した。次に、2.5M尿素を含む50 mM酢酸アンモニウム液（pH5.0）で平衡化したCM-トヨパール（TOSOH）に上清を添加して、R1及びhANPを吸着させた後、塩化ナトリウムの塩濃度勾配で溶出させ、hANP及びR1を含む画分を分取した。

#### 【0026】

得られた分画に20%（vol/vol）に相当する量の酢酸を加え、オクタデシル（C18）をリガンドとする逆相系カラム（soken ODS）に通液し、hANPをカラムに吸着させた後、アセトニトリル濃度勾配によりhANPを溶出させ、hANP及びR1を含む画分を分取した。

#### 【0027】

このようにして得られた分画を分析用逆相HPLCカラム（YMC-Pack ODS-A-302：4.6mm x 150mm）にかけ、R1のピークを分取することで、高純度のR1を得た。

#### （4）R1の構造分析

R1の構造分析は、エドマン法によるN末端からのアミノ酸配列、及びマススペクトル（エレクトロスプレー・イオニゼーション法）による分子量測定により行った。その結果、N末端からの配列はhANPの配列に一致していることが判明した。一方、マススペクトル分析の結果は分子量3122となり、hANPの分子量3080に比べ42だけ大きい分子であることが明らかとなった（図3）。これらの

分析結果を考察したところ、R1は何らかの修飾を受けたhANPであると推測された。この修飾基については+42の分子量及び細胞内で生じる修飾反応であることからアセチル基と推測された。hANPのアミノ酸配列からは、セリン残基、アルギニン残基及びチロシン残基に対する修飾の可能性が考えられるが、特にセリン残基での修飾の可能性が高いと考えられた。これはセリンのアセチル体であるO-アセチルセリンが細胞内で合成されることが知られており (Kredich, N. M. : Biosynthesis of cystein in Escherichia coli and Salmonella, second edition ASM press, p514-527) 、ポリペプチドへの翻訳時にO-アセチルセリンがセリンの代わりに取り込まれると考えられるためである。

### 【0028】

#### 【実施例3】 アミノ酸の添加とR1の生成抑制

##### (1) 培養

W3110/pGH $\alpha$ 97SIIの凍結保存菌を100mLのLBD培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%ブドウ糖、0.1Mリン酸カリウム緩衝液[pH7.0]) に接種し、37℃で約7時間振盪培養を行った。得られた培養液に最終濃度10%になるようにグリセロールを添加したのち1mLずつバイアル20本に分注し、凍結保存を行い以降の実験に用いた。

### 【0029】

この凍結保存菌を200mLの表1のNU培地 (但し、pH7.2、炭素源にはグルコース(4g/L)を使用し、酵母エキス0.1g/Lに変更したもの) に植え、33℃で一晩振盪培養した。菌体を遠心により集菌し、生理食塩水(0.9%NaCl)で一度洗浄し、最初の菌体濃度の7倍から8倍になるように生理食塩水(0.9%NaCl)を適量加え懸濁した。

### 【0030】

次に、この菌体懸濁液2mLを、L-アラニン、グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-メチオニン、L-システイン、L-トリプトファン、L-プロリン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-スレオニン、L-アルギニン、L-リジン及びL-ヒスチジンのいずれかを3g/Lの濃度で含む100mLのNU培地 (但し、pH6.9-7.

0、酵母エキスは0.1g/L、炭素源にはグリセリン（10g/L）を使用）に添加し、37℃で一晩培養した。

#### （2）封入体回収及びR 1 の生成抑制

各フラスコの培養液から遠心分離（7000rpm、20分）により菌体を回収後、5mlの脱イオン水に懸濁し、超音波細胞破碎機により破碎処理を行った。次に、遠心分離（12000rpm、5分）により封入体を沈殿画分に回収し、5mlの30mM Tris-HCl（pH9.3）緩衝液で懸濁し、再度遠心分離（12000rpm、5分）を行い、封入体の洗浄及び濃縮を行った。

#### 【0031】

次に、得られた封入体を5M 尿素を含む30mM Tris-HCl（pH9.3）緩衝液1mLに懸濁・溶解した。封入体は1mLの水に懸濁した場合、OD660値が22になる分量を使用した。融合タンパク質からのhANPの遊離は、0.004ユニット/mL反応液のAPIプロテアーゼ（和光純薬）を添加し、30℃で約150minの反応により行った。反応後、遠心分離（12000rpm、5分）を行い、得られた上清300μLに13.5～15.5μLの5%酢酸を添加し、450μLの精製水で希釈した。この操作で生じた沈殿は遠心分離（12000rpm、5分）により除去し、上清をHPLC（カラム：YMC-Pack ODS-A30 2）で分析した。R 1 濃度は、hANPに対するピークのエリアの面積比により算出した。

#### 【0032】

表2はhANPに対するR 1 の生成量を相対比較したものである。

#### 【0033】

## 【表2】

表2 hANPに対するR1の生成量の比較

添加アミノ酸	hANPに対する R1の相対比率 (%)	単位菌体あたりの 封入体生産量(相対 比)
添加なし	8.97	1.00
L-Lysine	6.42	1.88
L-Threonine	5.48	1.95
L-Methionine	4.15	1.84
L-Alanine	5.00	1.30
L-Tryptophan	10.08	0.76
L-Serine	5.24	1.24
L-Glycine	4.26	1.25
L-Histidine	3.71	1.39
L-Isoleucine	5.90	1.22
L-Glutamic acid	5.57	1.68
L-Glutamine	6.10	1.16
L-Arginine	5.02	1.92
L-Aspartic acid,	6.83	1.87
L-Asparagine	6.35	1.86
L-Proline	9.01	1.62

## 【0034】

その結果、検討を行ったアミノ酸の内、ヒスチジン、メチオニンあるいはグリシンの添加はR1の生成抑制に効果が大きく、対照（アミノ酸を添加しない場合）に比べ、50%以上R1の生成量が減少することが判明した。またこれらのアミノ酸の添加は菌体当たりの封入体生産量を増加させる効果があることが明らかとなった。R1生成抑制効果のあるヒスチジン、メチオニンあるいはグリシンの中では、メチオニン添加がhANPに対するR1生成量が最も低く、封入体生産量を含めて考慮した際に、R1の生成抑制に効果的であることが判明した。

## 【0035】

なお、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、及びL-システインは、融合タンパク質発現を低下させたため、封入体が回収できず、これらのアミノ酸の添加はhANP生産に有効でないことが明らかとなった。

## 【0036】

## 【発明の効果】

本発明は、形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することにより、副生成物ポリペプチドの生成を抑制する方法であって、特にセリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物ポリペプチドの生成を抑制する効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】 発現ベクターpGH $\alpha$  97SIIの模式図を示す。

【図2】 酵素反応の終了後、融合タンパク質から切り出されたhANPを逆相HPLCで分析した結果を示す。

【図3】 R1の構造分析に係るマススペクトル分析の結果を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>サントリー株式会社

<120>遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法

<130>001013

<160>1

<210>1

<211>28

<212>PRT

<213>ヒト

<223>hANP

<400>1

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

25

<210>2

<211>97

<212>PRT

<213>Escherichia coli

<223>N terminal of  $\beta$ -galactosidase

<400>2

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro

20 25 30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser

35 40 45

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro

50 55 60

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu

65 70 75 80

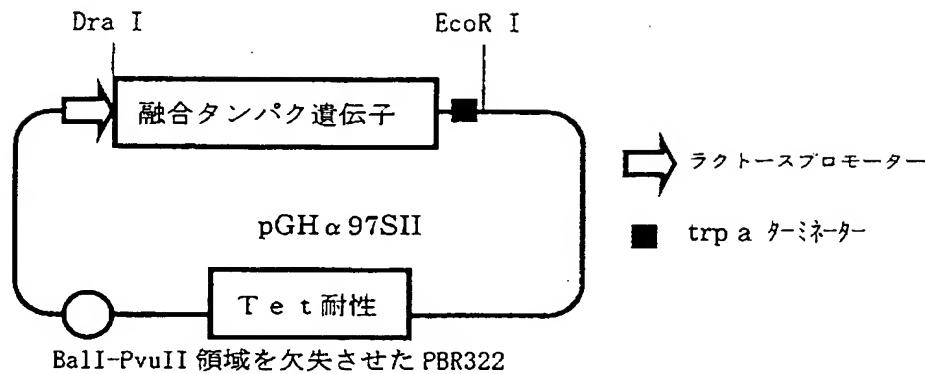
Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp

85 90 95

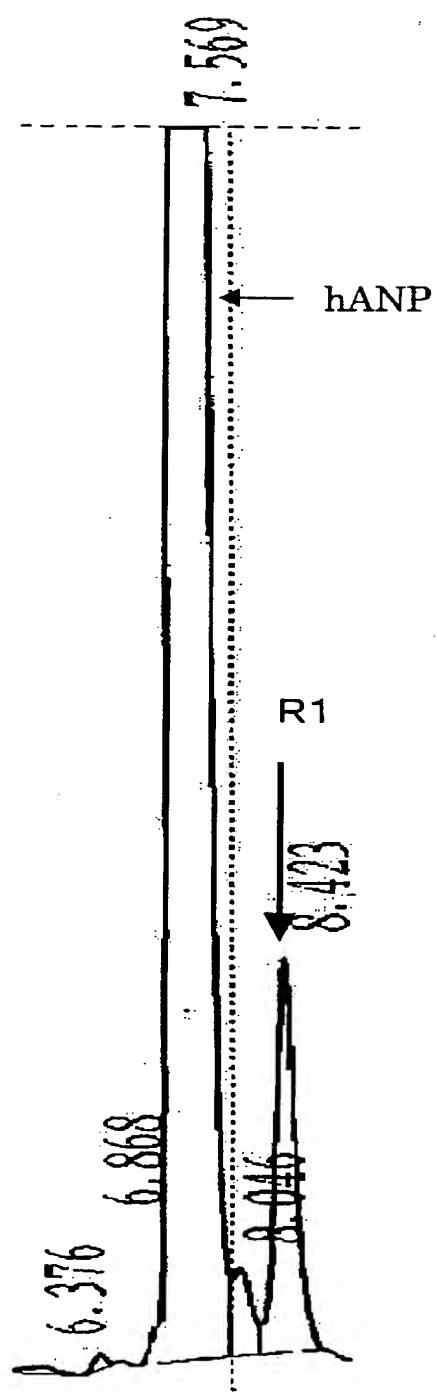
Ala

【書類名】 図面

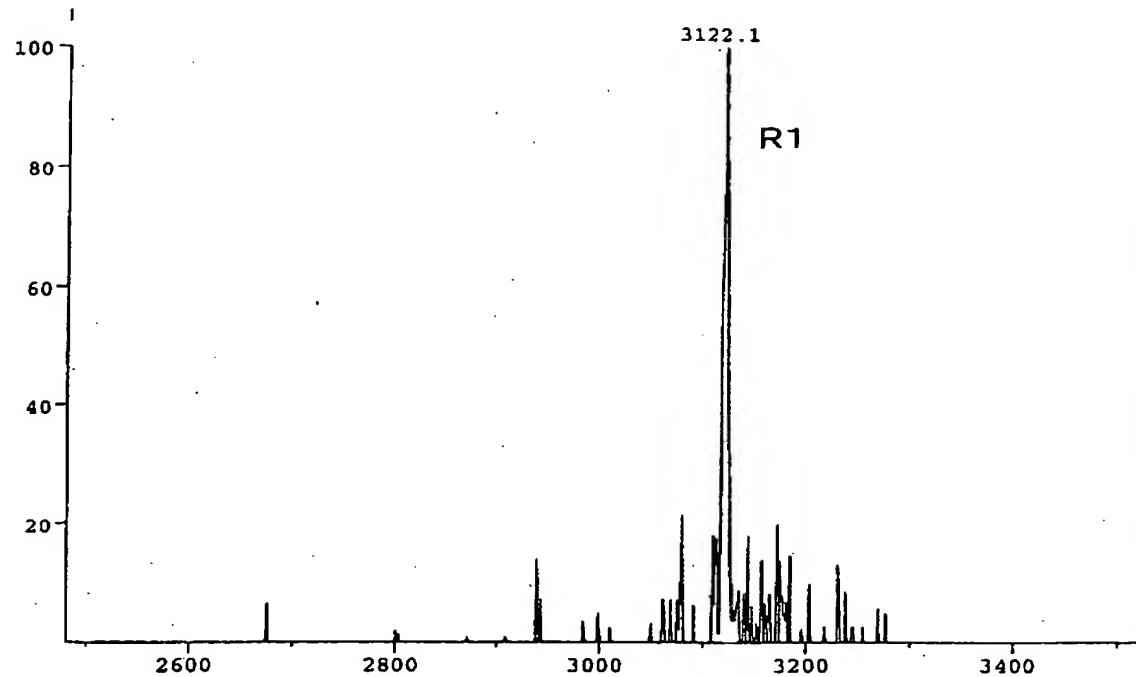
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法を提供する。

【解決手段】 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することによりセリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法、並びに、形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、セリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とするセリン残基を含有するポリペプチドの製造方法。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 001013I

【提出日】 平成12年 6月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-137228

【補正をする者】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

**【手続補正 1】**

**【補正対象書類名】** 特許願

**【補正対象項目名】** 発明者

**【補正方法】** 変更

**【補正の内容】****【発明者】**

**【住所又は居所】** 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716 番地

1 サントリー株式会社 医薬センター内

**【氏名】** 藤田 雅之

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716 番地

1 サントリー株式会社 医薬センター内

**【氏名】** 澤野 俊博

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716 番地

1 サントリー株式会社 医薬センター内

**【氏名】** 増田 由美子

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716 番地

1 サントリー株式会社 医薬センター内

**【氏名】** 大末 和廣

**【その他】** 本願出願時に発明者の1人を「藤田 雅之」と記載しましたが、正しい氏名は『藤田 雅之』であることが判明致しました。これは単なる事務手続上の誤りであり、何等意図したことではありませんので訂正して頂きたくお願い申し上げます。

**【プルーフの要否】** 要

特願 2000-137228

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
氏名 サントリー株式会社